

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Morphologische Untersuchungen von Mycoplasmen
unter der Einwirkung von Antibiotica

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Knut Albrecht Schneider

aus Magdeburg

Mainz 1975

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Morphologische Untersuchungen von Mycoplasmen
unter der Einwirkung von Antibiotica

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Knut Albrecht Schneider

aus Magdeburg

Mainz 1975



Fachbereichsdekan: Professor Dr. Klein

Referent: Professor Dr. W. Bredt

Korreferent: Professor Dr.Dr. J.E. Hausamen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	6
1. Mycoplasmen	6
2. Nährböden	6
3. Deckglaskammern	6
4. Ermittlung der Keimzahl	7
5. Ermittlung der Latenzphase	7
6. Ermittlung der MIC	7
7. Ermittlung der MCC	9
8. Beobachtung morphologischer Veränderungen	9
9. Mikroskopie und Mikrofotografie	10
10. Statistische Auswertung	10
Ergebnisse	11
1. Ermittlung der Latenzzeit	11
2. Ermittlung der MIC	13
3. Ermittlung der MCC	13
4. Morphologische Veränderungen	17
Diskussion	37
Untersuchungstechnik	37
Morphologische Veränderungen	40
Zusammenfassung	42
Literatur	45

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung

Die therapeutisch wirksamen Antibiotica beeinflussen die Lebensfähigkeit der Bakterien über verschiedenartige Mechanismen (8). Den unterschiedlichen Einwirkungsmöglichkeiten stehen nur wenige mikroskopisch erfaßbare Veränderungen der lebenden Zelle gegenüber (1, 22), obwohl deutliche Veränderungen der Ultrastruktur zu beobachten sind (18). Lediglich zellwandwirksame Antibiotica, z.B. Penicillin, bewirken zum Teil erhebliche morphologische Veränderungen der noch lebensfähigen Zelle (27, 26, 17). Offensichtlich verhindert die intakte Zellwand bei anderen Antibiotica größere morphologische Effekte. Daher erschien es interessant, entsprechende Studien an zellwandlosen Mikroorganismen durchzuführen. Hierzu boten sich in erster Linie die Mycoplasmen an, die keinerlei Zellwand besitzen (13) und definierte, wenn auch verschiedenartige Zellformen ausbilden (9). Die ebenfalls zellwandlosen oder zellwanddefekten bakteriellen L-Formen erschienen weniger geeignet, da sie eher irreguläre Zellformen besitzen (5).

Mycoplasmen sind bakterienähnliche Mikroorganismen, die 1898 von NOCARD und Mitarbeitern erstmals beschrieben und 1956 von EDWARD und FREUNDT (6) als Mycoplasmatales in die Systematik eingeordnet wurden. Sie bilden als Mollicutes eine eigene Klasse (7). Seit 1937 sind zahlreiche Isolierungen aus menschlichen Untersuchungsmaterialien durchgeführt worden.

Mycoplasmen fanden sich als apathogene und fakultativ pathogene Besiedler der Schleimhäute des Urogenital- und Respirationstraktes (13).

Aus den beim Menschen vorkommenden Mycoplasma-Arten wurden M.pneumoniae und M.hominis als Modellstämme für die Untersuchungen ausgewählt. Beide besitzen eine charakteristische Morphologie (2, 3). Bei M.pneumoniae wurden darüberhinaus schon bei früheren Untersuchungen morphologische Veränderungen durch Tetracyclin gefunden (2). Für M.pneumoniae ist die Pathogenität (Erreger primär atypischer Pneumonien) klinisch und experimentell nachgewiesen, während M.hominis im Bereich des Urogenitaltraktes gelegentlich Infektionen hervorrufen kann.

Die therapeutisch verwendeten Antibiotica lassen sich nach ihren Wirkungsorten - Zellwand, Zytoplasmamembran und Proteinsynthese - in drei große Gruppen einteilen (8).

Als Vertreter der ersten Gruppe wählten wir für die vorliegende Untersuchung das Cephaloridin, das wie Penicillin die Biosynthese der Bakterienzellwand hemmt. Dies wird auf die Blockierung der Transpeptidasenreaktion beim Aufbau von Zellwandstrukturen zurückgeführt. Deshalb ist eine Schädigung durch Cephaloridin nur dann zu erreichen, wenn sich die Bakterien in der Vermehrungsphase befinden (26). Penicillin wurde nicht untersucht, da seine Wirksamkeit bei Mycoplasmen mit einer Ausnahme hinreichend

bekannt ist (28). Von denjenigen Antibiotica, die eine Schädigung an der Zytoplasmamembran hervorrufen, wählten wir Colistin und Nystatin. Colistin wurde 1950 von KOYAMA (26) aus dem sporenbildenden Bacillus Colistinus isoliert. Seine Wirkung beruht darauf, daß es an die Phosphatidkomponente der Membran gebunden wird und damit die Permeabilität, den aktiven und passiven Transportmechanismus stört. Nystatin, 1950 von HAZEN und BROWN (26) aus Kulturfiltraten des Streptomyces noursei isoliert, schädigt ebenfalls die Zytoplasmamembran, indem es sich an deren Cholesterinkomponente bindet (26). Acholeplasma laidlawii, das auf normalem Medium gezüchtet wird, ist gegen Nystatin resistent. Erst wenn man ihm durch Nährböden mit Serumgehalt die Gelegenheit gibt, Cholesterin in die Membran einzubauen, ist es gegen Nystatin empfindlich (8). Bakterien, deren Zellmembran kein Cholesterin enthält, sind auf Nystatin nicht sensibel.

Aus der dritten Gruppe der Antibiotica, die auf die Proteinbiosynthese Einfluß nehmen, wählten wir Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Erythromycin und das mycoplasmawirksame Tylosin (24). Streptomycin wurde in den frühen vierziger Jahren von WAKSMAN entdeckt. Seine Wirkung beruht darauf, daß es die Ableseprozesse an den Codonen beeinflusst, sodaß es zu Fehlern in der Aminosäuresequenz kommen kann (11). Das Chlor-

amphenicol, ein von BURKHOLDER entdecktes Antibioticum bindet sich an die 50 S-Untereinheiten der Ribosomen. Es behindert so die zur Polysombildung notwendige Bindung von m-RNS an der Grenze zwischen 30 S- und 50 S-Einheiten (26). In seinem Wirkungsmechanismus dem Chloramphenicol sehr ähnlich ist das Tetracyclin. Es wurde 1945 entdeckt und hemmt die Proteinsynthese der Zellen an den Ribosomen. Bevorzugte Stellen sind die 80 S- und 70 S-Einheiten (26).

Ebenfalls dem Chloramphenicol in seinem Wirkungsmechanismus ähnlich ist das Erythromycin (26).

Das gegen Parasiten wirksame Chemotherapeuticum Resochin (Chloroquin) wurde mit untersucht, da von TAYLOR-ROBINSON (25) eine Wirksamkeit gegen Mycoplasmen berichtet wurde.

Die Empfindlichkeit der Mycoplasmen gegen Antibiotica weist erhebliche Unterschiede auf. Sie sind gegen zellwandwirksame Antibiotica weitgehend resistent. Von anderen Antibiotica werden sie unterschiedlich beeinflusst (13, 4, 24, 23, 15). Sie sind sensibel gegenüber Antibiotica, die auf die Proteinsynthese wirken. Gegenüber Substanzen, die an der Zytoplasmamembran angreifen, finden sich resistente Arten. So ist M. orale gegenüber Nystatin (20) und sind die T-Mycoplasmen gegenüber Colistin resistent (4).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Wirkung der oben angeführten Antibiotica auf die Morphologie von M. pneumoniae

und M.hominis festzustellen. Hierzu wurde zunächst die minimale Hemmkonzentration und die abtötende Konzentration ermittelt. In einem zweiten Schritt wurde das Verhalten der Mycoplasmazellen unter dem Einfluß unterschiedlicher Wirkstoffkonzentrationen mikroskopisch beobachtet.

Material und Methoden

1. Mycoplasmen . Die Untersuchungen wurden mit folgenden Mycoplasma-Arten durchgeführt:
 - a) Mycoplasma pneumoniae Stamm FH
 - b) Mycoplasma hominis Stamm W444/69 (3)Von beiden Mycoplasma-Arten wurden je 100 ml des flüssigen Mediums beimpft. Nach entsprechender Bebrütung (M.hominis 1 Tag, M.pneumoniae bis zu 4 Tagen) wurde das bewachsene Medium durch Nuclepore-Filter (General Electric Co.) mit Porengröße 0,4 μ m filtriert. Dadurch wurden die normalerweise vorhandenen Zellaggregate auseinandergerissen oder zurückgehalten. Das Filtrat enthielt überwiegend Einzelzellen (2). Die Mycoplasma-Suspensionen wurden in Röhrchen zu je 1 ml abgefüllt und bei -70° C eingefroren.
2. Nährböden . Folgende Nährmedien wurden verwendet:
 - a. Das flüssige Medium bestand aus
 - 70 % PPLO Broth (DIFCO-Laboratories) ,
 - 20 % Pferdeserum (Microbiological Associates oder Flow Laboratories) ,
 - 10 % eines 25 %igen Hefeextraktes (Fleischmann's Pure Dry Yeast Type 4020) (12).Diesem Medium wurden jeweils weitere Substanzen in der gewünschten Konzentration zugesetzt.
 - b. Das Agarmedium bestand aus
 - 70 % PPLO Agar (DIFCO) ,
 - 20 % Pferdeserum ,
 - 10 % des 25 %igen Hefeextraktes.
 - c. Als Verdünnungsflüssigkeit für Keimzählungen wurde PPLO Broth (DIFCO) mit 5 % Pferdeserum verwendet.
3. Deckglaskammern . Für morphologische Studien wurden die Mycoplasmen in Deckglaskammern gezüchtet und im Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Die Kammern bestanden aus einem unteren Deckglas (22 x 22 mm), einem Glasring, der mit Siliconfett am Glas befestigt war, und einem weiteren Deckglas (18 x 18 oder 22 x 22), das als oberer Abschluß der Kammer diente. Es war ebenfalls mit Siliconfett befestigt (2).

4. Ermittlung der Keimzahlen. Von den eingefrorenen Mycoplasmen wurden je 1 ml bei Zimmertemperatur aufgetaut. Von jedem Stamm wurden drei parallele Verdünnungsreihen (bis 10^{-6}) angelegt. Aus den Verdünnungen, 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} bei M.hominis und 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} bei M.pneumoniae wurden mit einer Microliter-Pipette (Eppendorf) dreimal je $10 \mu\text{l}$ entnommen und auf Agar-medium aufgetropft. M.hominis wurde anaerob bei 37°C in einem BTL-Anaerobtopf bebrütet. Das verwendete Gasgemisch setzte sich aus 95 % Stickstoff und 5 % CO_2 zusammen. M.pneumoniae wurde bei 37°C aerob bebrütet.

Die gewachsenen Kolonien wurden bei M.hominis nach 3 Tagen und bei M.pneumoniae nach 10 - 11 Tagen gezählt. Ausgewertet wurde nur diejenige Verdünnung, bei der die Zahl der Kolonien pro $10 \mu\text{l}$ - Tropfen zwischen 10 und 100 lag. Es ergaben sich 2×10^8 koloniebildende Einheiten (kBE) pro ml bei M.hominis und 3×10^7 kBE/ml bei M.pneumoniae.

5. Ermittlung der Latenzphase. Je 1 ml des eingefrorenen Inoculums von M.hominis und M.pneumoniae wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut, danach 1/20 mit flüssigem Medium verdünnt (3,8 ml Medium auf 0,2 ml Inoculum). Aus diesen Ansätzen wurde sofort 0,05 ml für eine Zählung entnommen. Danach wurden die Ansätze in einem Schüttelwasserbad bei 37°C bebrütet. Im Abstand von je einer Stunde wurden je drei Proben aus den Ansätzen entnommen (0,05 ml) und nach dem oben angegebenen Verfahren gezählt.

6. Ermittlung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC).

Von den verwendeten Antibiotica bzw. Chemotherapeutica wurden in Aqua dest. folgende Stammlösungen hergestellt.

Cephaloridin (Lilly)	100 mg/ml
Chloramphenicol (Parke Davis, Apoth. Mainz)	2 mg/ml
Colistin (Grünenthal GmbH)	10 mg/ml
Erythromycin (Boehringer Mannheim)	1 mg/ml
Nystatin (Heyden München)	10 mg/ml
Resochindiphosphat (Bayer Leverkusen)	10 mg/ml
Streptomycinsulphat (Serva)	20 mg/ml
Tetracyclinbase (Serva)	0,5 mg/ml
Tylosine (Grand Island Biological Company)	0,6 mg/ml

Die MIC wurde mit dem Stoffwechselhemmtest (21) ermittelt. Dabei wurde einer Lösung der zu untersuchenden

Substanz Mycoplasmen und ein indikatorhaltiges (0,002 % Phenolrot) Nährmedium zugesetzt, das 1 % Glucose (bei *M.pneumoniae*) oder 1 % Arginin (bei *M.hominis*) enthielt. Das Ausbleiben eines Indikatorumschlages (pH-Änderung) zeigt an, daß die eingebrachte Substanz die Mycoplasmen in ihrem Stoffwechsel gehemmt hat.

- a. Der Test wurde mit Hilfe der Microtiter-Einrichtung (Cooke Engineering Co.) durchgeführt. Die Antibiotica-verdünnung in den Platten geschah meist durch Microdiluter (0,025 ml). Bei verschiedenen Ansätzen wurde die Verdünnung mit Eppendorf-Pipetten in Microtiter-Platten vorgenommen. Der Testansatz wurde wegen der erforderlichen Sterilität in einem Laminar Flow-Gerät (Gelair) durchgeführt.

Der Versuch wurde bei Verwendung von Microdilutern folgendermaßen angesetzt:

- 0,025 ml Vorgabe von Arginin- oder Glucose-Medium in sämtliche Löcher der Platte durch kalibrierte Tropfpipetten.
- 0,025 ml Antibioticastammlösung ins erste Loch (Microdiluter). Anlegen der Verdünnungsreihe mit den Microdilutern (in 2er-Stufen).
- 0,15 ml Auffüllen mit Medium (kalibrierte Tropfpipette)
- 0,025 ml Zugabe des Inoculums (kalibrierte Tropfpipette).

Danach wurden die Platten mit einer durchsichtigen Plastikfolie verschlossen.

Testverfahren bei Verdünnung mit Eppendorf-Pipetten:

- 0,1 ml Vorgabe von Medium mit kalibrierten Tropfpipetten.
- 0,1 ml Antibioticastammlösung ins erste Loch (Eppendorf-Pipette). Anlegen der Verdünnungsreihe mit der Eppendorf-Pipette (in 2er-Stufen).
- 0,075 ml Auffüllen mit Medium (kalibrierte Tropfpipetten).
- 0,025 ml Zugabe des Inoculums

- b. Die Versuche wurden jeweils mit hoher und niedriger Konzentration (Inoculum 1 : 100 oder 1 : 10 000 vorverdünnt) durchgeführt. Bei jedem Versuch wurde eine beimpfte Kontrollreihe ohne Antibioticum und eine unbeimpfte Reihe mit Antibioticum mitgeführt.

Der Test wurde zu zwei Zeitpunkten abgelesen:

- c. Als sogenannter Frühwert, wenn die Kontrollreihe ohne Antibioticum einen gerade sichtbaren Indikatorumschlag, nach der alkalischen Seite, von ca. einer halben pH-Stufe zeigte (21).
- d. Als sogenannter Spätwert, wenn der Titer sich trotz weiterer Bebrütung nicht weiter veränderte.
Jede der geprüften Substanzen wurde jeweils in 8 Reihen getestet. Die gesamten Ansätze wurden zweimal durchgeführt. Bei M.hominis wurde ein Indikatorumschlag zum Alkalischen (rot), bei M.pneumoniae ein Umschlag ins Saure (gelb) abgelesen.

7. Ermittlung der mycoplasmociden Konzentration (MCC). Ausgehend von einem Wert nahe der ermittelten MIC (im folgenden als MIC bezeichnet) wurden folgende Substanzkonzentrationen geprüft: $1/2$ MIC, $2-$, $4-$, $8-$, $16-$ und $32-$ fache MIC.

Die Versuche wurden in 4 ml-Glasröhrchen mit Schraubverschluß angesetzt. Verwendet wurde das flüssige Medium mit Zusatz von 0,002 % Phenolrot. In sieben Röhrchen wurden je 0,2 ml Medium vorgegeben. In Röhrchen 1 wurden 0,2 ml der 128-fachen MIC des Antibioticums hinzugegeben und vermischt. Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe (1 : 2) bis zum 7. Röhrchen durchgeführt. Danach wurden die Röhrchen mit je 0,15 ml flüssigem Medium und 0,05 ml Inoculum aufgefüllt. Ein achttes Röhrchen wurde ohne Antibioticum, als Kontrolle mitgeführt. Im Abstand von 2 Stunden wurden aus den Röhrchen ca. 0,01 ml mit einer kalibrierten Öse entnommen und in 0,1 ml Flüssigmedium verdünnt. Dieser Schritt sollte die Konzentration des Antibioticums um etwa das Zehnfache verringern, um eine fortgesetzte Hemmwirkung des Antibioticums auf dem Agar zu verhindern. Aus dieser Verdünnung wurden dann 10 μ l entnommen und auf Agar aufgetropft.

Die Platten mit M.hominis wurden 4 Tage anaerob und solche mit M.pneumoniae 10 Tage aerob bebrütet bevor die Kolonien auf dem Agar abgelesen wurden.

8. Beobachtung morphologischer Veränderungen unter dem Einfluß antibiotischer Substanzen. Sowohl für M.hominis als auch für M.pneumoniae wurde Inoculum mit einer Keimzahl von 10^4 kbE/ml angesetzt. Damit wurden Deckglaskammern gefüllt und bei 37 °C bebrütet. Bei M.hominis hatten sich nach 24 Stunden und bei M.pneumoniae nach 48 Stunden mäßig viele Zellen bzw. Kolonien am unteren Deckglas abgesetzt.

Die Deckglaskammern wurden vorsichtig geöffnet und mit einer Pasteurpipette leergesaugt. Sie wurden sofort wieder mit neuem Medium gefüllt, das die zu untersuchenden Konzentrationen des Antibioticums enthielt.

Untersucht wurden folgende Konzentrationen: 1 MCC, 1 MIC, 1/2 MIC und eine Konzentration, die zwischen MIC und MCC lag.

Die Kammern wurden bei 37° C bebrütet und alle 2 Stunden mikroskopisch beobachtet.

9. Mikroskopie und Mikrophotographie . Die mikroskopische Beobachtung der Mycoplasmen wurde an 2 Zeiss-Photomikroskopen mit Phasenkontrasteinrichtung (Kondensor mit 7 mm Schnittweite) durchgeführt. Bei den meisten Versuchen wurde an dem einen Mikroskop eine Kammer kontinuierlich beobachtet. Die Inkubation erfolgte hier durch ein thermistor-gesteuertes Wärmegebläse (Air Curtain Incubator, Sage Instruments). Die Aufnahmen erfolgten auf Kodak Plus-X-Film.
10. Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen und die Standardabweichungen des Mittelwertes beim Stoffwechselhemmtest ermittelt.

Ergebnisse

1. Ermittlung der Latenzzeit bei der Anzüchtung eingefrorener Mycoplasmastämme

Von den aufgetauten und in frischem flüssigem Medium bebrüteten Mycoplasmen wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Zahl der kbE/ml ermittelt.

Die Ergebnisse für M.hominis sind in Abbildung 1 dargestellt. In den ersten 2 Stunden blieb die Keimzahl völlig gleich. Mit Ablauf der dritten Stunde begann die Vermehrung und bald darauf der Übergang in die logarithmische Wachstumsphase.

Die Ergebnisse für M.pneumoniae sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Werte der Abbildung 2 zeigten eine bis 20 Stunden dauernde Latenzzeit, in der die Keimzahl geringfügig abfällt. Danach zeigt sich bis zur 23. Stunde ein Anstieg der kbE. Nach 24 Stunden fällt die Zahl der Kolonien wieder ab.

Die weiteren Versuche, in denen die wirksamen Konzentrationen der Antibiotica ermittelt werden sollten, erforderten Keime, die sich in der Vermehrungsphase befanden. Daher wurde M.hominis nach dem Auftauen stets 4 Stunden vorgebrütet, für M.pneumoniae wurde eine Vorinkubation von 20 - 22 Stunden gewählt.

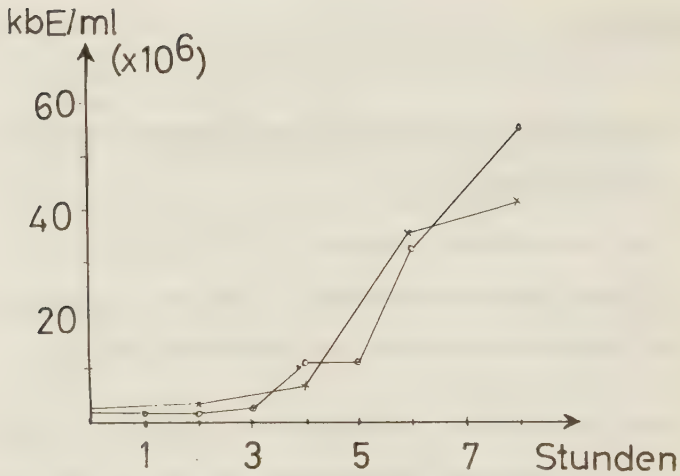


Abbildung 1: Anstieg der kbE/ml in aufgetauten
M. hominis - Kulturen bei fortlaufender
Bebrütung (Ansätze 1 und 2)

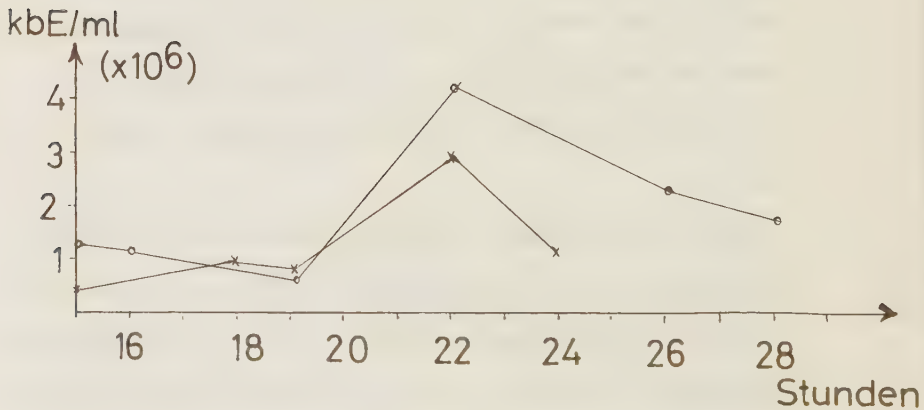


Abbildung 2: Anstieg der kbE/ml in aufgetauten
M. pneumoniae - Kulturen bei fortlaufender
Bebrütung (Ansätze 1 und 2)

2. Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MIC)

Mit dem Stoffwechselhemmtest wurden für alle Antibiotica die minimalen Hemmwerte ermittelt. In Tabelle 1 sind die bei beginnendem Farbumschlag (Frühwert) abgelesenen Werte zusammengestellt.

Die ebenfalls ermittelten Spätwerte differierten ganz erheblich. Zum Teil waren sie auch wegen beginnender Austrocknung oder bakterieller Kontamination der Ansätze nicht verwendbar. Sie sind daher hier nicht aufgeführt.

Um einen Einfluß der Größe des Inokulums auf die MIC auszu-schließen, wurden alle Ansätze sowohl mit ca. 250 kbE/Loch, als auch mit ca. $2,5 \times 10^4$ kbE/Loch durchgeführt.

In den Frühwerten zeigten sich keine Titerunterschiede. Der Farbumschlag erfolgte allerdings bei den niedrigen Keimzahlen regelmäßig 1 - 2 Tage später als bei den hohen Einsaaten. Die Spätwerte differierten erheblich und wurden aus den schon genannten Gründen nicht verwendet.

3. Ermittlung der mycoplasmociden Konzentration (MCC)

Für die weiteren Versuche wurden als MCC diejenigen Konzentrationen bezeichnet, bei denen 24 - 48 Stunden nach Versuchsbeginn die Keimzahl . . . abgesunken war. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 2 dargestellt. Tabelle 3 zeigt ein typisches Versuchsprotokoll.

Antibiotica	<u>M.hominis</u>		<u>M.pneumoniae</u>	
	Hemmwerte in $\mu\text{g/ml}$ ¹⁾	Standardabweichung	Hemmwerte in $\mu\text{g/ml}$ ¹⁾	Standardabweichung
Cephaloridin	244, 12	+ 87,34 - 87,34	2,287	+ 0,416 - 0,416
Chloramphenicol	0,793	+ 0,2437 - 0,2437	0,585	+ 0,107 - 0,107
Colistin	n.v. ²⁾	n.v.	41,512	15,709
Erythromycin	117, 187	+ 21,347 - 21,347	0,0012	0,0
Nystatin	73, 22	13,32	29,296	5,34
Resochin	56, 15	23,52	18,33	3,34
Streptomycin	9,7606	4,3588	0,78	0,0
Tetracyclin	0,1051	0,0685	0,078	0,0
Tylosin	0,658	0,199	0,0027	0,0

Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentrationen für M.hominis und M.pneumoniae,
Frühwerte.

1) Mittelwert aus 16 Messungen

2) n.v.: Versuch nicht verwertbar

Antibiotica	<u>M.hominis</u>	<u>M.pneumoniae</u>
	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)
Cephaloridin	> 6240,0 ¹⁾	> 78,08
Chloramphenicol	15,68	10,0
Colistin	---	1251,2
Erythromycin	1000,0	0,0195
Nystatin	156,2	125 $\mu\text{g/ml}$
Resochin	312,0	156,4
Streptomycin	39,0	12,48
Tetracyclin	1,0	2,44
Tylosin	2,342	0,0856

Tabelle 2: Mycoplasmocide Konzentrationen für M.hominis
und M.pneumoniae (ermittelt in zwei Bestimmungen).

1) Keine erkennbare Verminderung der Keimzahl

Nr. der Messung	Stunde	Chloramphenicol-Konzentration, bezogen auf MIC							
		32x	16x	8x	4x	2x	1x MIC	1/2x MIC/2	Kontrolle ohne Chlor.
1	0	150	150	150	100	150	150	150	150
2	2	150	100	150	150	150	100	100	100
3	4	100	130	150	150	200	200	200	>300
4	6	100	100	100	100	200	200	250	>300
5	8	100	100	100	100	300	300	300	>300
6	10	80	100	100	150	250	300	>300	>300
7	12	70	100	100	130	200	300	>300	>300
8	24	5	25 ¹⁾	60	100	>300	>300	>300	>300
9	48	0	0	4	4	>300	>300	>300	>300

Tabelle 3: Typisches Versuchsprotokoll bei der Bestimmung der MCC von Chloramphenicol bei M.hominis.

1) Aufgrund der deutlichen Reduktion innerhalb 24-48 Std. wurde die 16-fache MIC als MCC angenommen.

4. Morphologische Veränderungen der Mycoplasmen unter Einwirkung der Antibiotica

a. M.hominis

Normales Aussehen: Nicht behandelte Zellen des untersuchten M.hominis - Stammes können eine unterschiedliche Form besitzen. Überwiegend sind kleine Ring- bzw. Scheibenformen, kurze Filamente und kokkoide Zellen vorhanden (siehe Abbildung 3).

Einwirkung von Cephaloridin:

MCC: Nach 5 Stunden begannen die Zellen sich abzurunden (Abbildung 4a), nach 8 1/2 Stunden sah man Vergrößerungen (Abbildung 4b). Daneben fanden sich noch intakte Zellen. Nach 24 Stunden blieben lediglich Zelltrümmer übrig (Abbildung 4c). Eine Vermehrung hatte in dieser Zeit nicht stattgefunden.

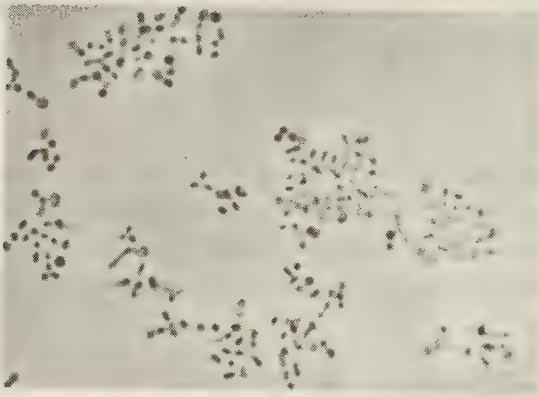
Halbe MCC: Während der ersten 8 1/2 Stunden (Abbildung 4d) ergaben sich keine deutlichen Formveränderungen. Nach 24 Stunden fanden sich geschwollene und vakuolige Zellen (Abbildung 4e).

MIC und halbe MIC: Hier konnte man auch nach 24 Stunden keinen sicheren Effekt sehen. In Form und Vermehrung glich dieser Ansatz der Kontrolle.

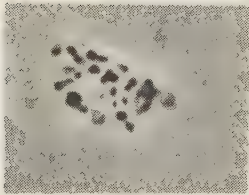
Einwirkung von Chloramphenicol:

MCC: Beginnend nach einer Stunde sah man zunehmend Zellen, die geschwollen und kokkoid erschienen (Abbildung 5a). Nach 10 Stunden waren fast alle Zellen geschwollen und vergrößert (Abbildung 5b). Ihre Zahl nahm nach 20 Stunden ab, es waren fast nur noch Zelltrümmer zu sehen (Abbildung 5c).

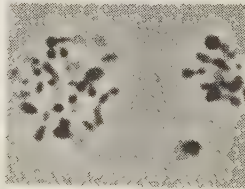
Halbe MCC: Nach 3 Stunden zeigten viele Zellen eine Schwellung (Abbildung 5d). Nach 5 Stunden erschienen vermehrt



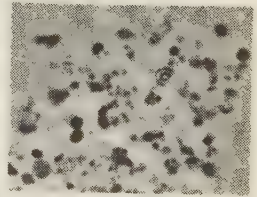
3. Normales Aussehen von M.hominis



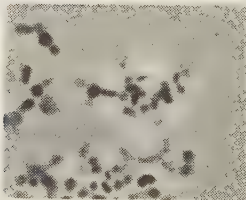
a



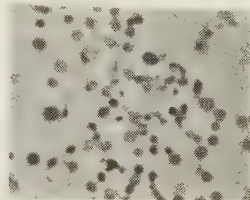
b



c



d



e

4. Veränderungen von M.hominis unter Einwirkung von Cephaloridin.

MCC-Konzentration, nach: a) 1 Stunde b) 5 St. c) 24 St.

MIC-Konzentration, nach: d) 3 1/2 St. e) 24 St.

größere Ringe (Abbildung 5e), die nach 7 und 10 Stunden verschwunden waren. Zu diesem Zeitpunkt überwogen kokkoide Zellen, die nach 20 Stunden (Abbildung 5f) vakuolig degenerierten oder zerfielen.

MIC: Nach 10 Stunden traten erste Veränderungen in Form von Schwellung und Vakuolisierung auf, die sich bis zu 20 Stunden vermehrt fortsetzten. Jedoch überwog hier das Bild intakter Zellen. Es fand eine reichliche Vermehrung statt.

Halbe MIC: Bis zu 20 Stunden zeigten sich keine Veränderungen. Danach entwickelten sich feine Fadenstrukturen, die gelegentlich in Ringen und Halbkreisen gelagert waren. Ein Teil der Zellen erschien etwas kleiner.

Einwirkung von Erythromycin:

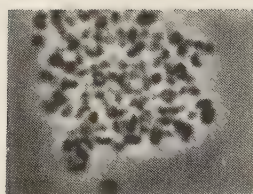
MCC und halbe MCC: Nach 3 Stunden sah man vereinzelt etwas vergrößerte Zellen, die sich nach 9 Stunden zu vakuoligen Strukturen entwickelten. Die übrigen Zellen erschienen kleiner. Nach 10 1/2 Stunden (Abbildung 6) fand sich ein vermehrtes Auftreten von Ringstrukturen. Nach 24 Stunden waren nur noch wenige große Zellen zu sehen.

MIC und halbe MIC: Bei diesen Konzentrationen ließen sich keine deutlichen Veränderungen feststellen.

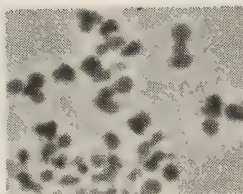
Einwirkung von Nystatin:

MCC: Bereits nach 10 Minuten waren alle Zellen abgerundet und teilweise geschwollen (Abbildung 7a). Dieses Bild änderte sich in den nächsten 5 Stunden kaum (Abbildung 7b), die Zahl der geschwollenen, blassen Zellen nahm zu. Nach 24 Stunden (Abbildung 7c) waren nur noch blasse, überwiegend vakuolige Zellen zu sehen, die am Rande einen schwarzen Punkt enthielten.

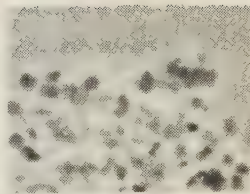
MIC: Auch beim MIC-Wert sah man bereits nach 15 Minuten überwiegend abgerundete Formen (Abbildung 7d). Nach einer Stunde



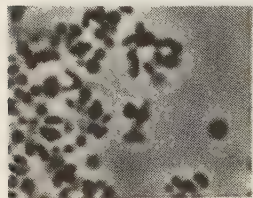
a



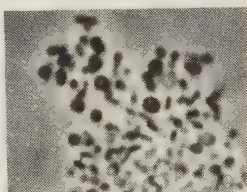
b



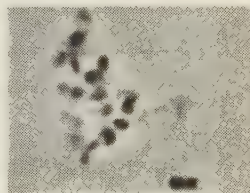
c



d



e

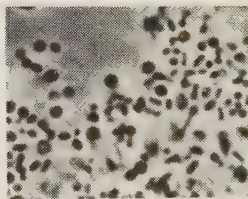


f

5. Veränderungen von M.hominis unter Einwirkung von Chloramphenicol.

MCC-Konzentration, nach: a) 1 St. b) 10 St. c) 20 St.

MIC-Konzentration, nach: d) 3 St. e) 5 St. f) 20 St.



a

6. Veränderungen von M.hominis unter Einwirkung von Erythromycin

MCC-Konzentration, nach: a) 10,5 Stunden

jedoch fand man neben den vakuoligen Zellen kurze Fäden und intakt aussehende Bereiche (Abbildung 7e). Die vakuoligen Gebilde waren nach 5 Stunden vollständig verschwunden (Abbildung 7f). Zellformen und Vermehrung erschienen normal. Halbe MIC: Nach 3 Stunden fand man eine vermehrte Fadenbildung der Zellen. Nach 24 Stunden hatte die Zellzahl stark zugenommen, besondere Formen wurden nicht gefunden.

Einwirkung von Resochin:

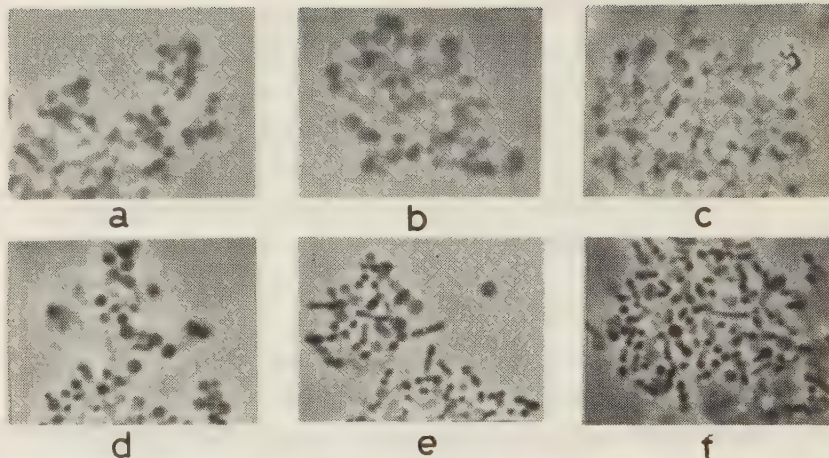
MCC: Bereits nach einer Stunde begannen die Zellen sich abzurunden (Abbildung 8a). Nach 3 Stunden fand man fast nur noch leicht geschwollene Strukturen (Abbildung 8b). Nach 24 Stunden war die Schwellung fortgeschritten, die meisten Zellen wirkten blaß und schemenhaft (Abbildung 8c).

Halbe MCC: Erst nach 6 Stunden war eine Abrundung und Vergrößerung der Zellen erkennbar (Abbildung 8d). Bis zur 8. Stunde nahm die Zellzahl zu (Abbildung 8e). Nach 24 Stunden (Abbildung 8f) fanden sich sehr große vakuolige Zellen, einige von ihnen waren sehr dunkel, andere durchscheinend. Letztere trugen an der Außenwand oft einen dunklen Punkt.

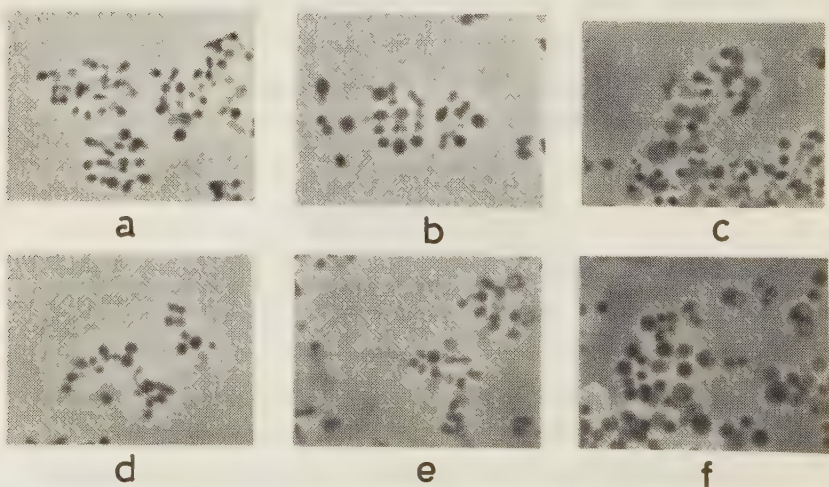
MIC und halbe MIC: Nach 8 Stunden zeigten sich noch keine sicheren Veränderungen. Nach 24 Stunden waren wie bei der MCC geschwollene Zellen mit dunklem und blassem Inhalt zu sehen.

Einwirkung von Streptomycinsulfat:

MCC: Bis zur 3. Stunde fand sich nur eine angedeutete Schwellung einzelner Zellen (Abbildung 9a). Nach 5 Stunden waren Fadenstrukturen und Ketten zu sehen (Abbildung 9b). Die Ketten verschwanden nach 7 Stunden und es erschienen mehr runde, vergrößerte Zellen (Abbildung 9c). Nach 24 Stunden waren nur noch vakuolige, blasige Zellen zu sehen, die meist einen schwar-



7. Veränderungen von M.hominis unter Einwirkung von Nystatin
MCC-Konzentration, nach: a) 10 Min. b) 5 St. c) 24 St.
MIC-Konzentration , nach: d) 15 Min. e) 1 St. f) 5 St.



8. Veränderungen von M.hominis unter Einwirkung von Resochin
MCC-Konzentration, nach: a) 1 St. b) 3 St. c) 24 St.
halber MCC-Konzentration, nach: d) 6 St. e) 8 St. f) 24 St.

zen Punkt an der Zellperipherie trugen (Abbildung 9d).

Halbe MCC: Die Zellen zeigten bis zur 5. Stunde ein fast normales Bild (Abbildung 9e). Nach 7 Stunden fiel eine starke Fadenbildung auf (Abbildung 9f). Nach 10 Stunden fanden sich zahlreiche, deutlich vergrößerte Zellen. Nach 24 Stunden waren nur noch vereinzelt große, dunkle Zellen vorhanden (Abbildung 9g). Zwischen den verbliebenen Zellfragmenten waren noch vereinzelt große, vakuolige Strukturen zu erkennen.

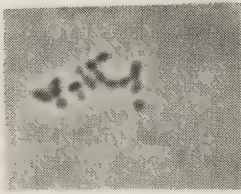
MIC: Bis zur 5. Stunde waren keine sicheren Veränderungen zu erkennen, die Zellen vermehrten sich. Von der 5. bis zur 24. Stunde wurden vermehrt Fäden gebildet. Daneben lagen vereinzelt große, abgerundete Zellen. Die Zahl der Zellen hatte stark zugenommen.

Halbe MIC: Nach 7 Stunden waren vereinzelt blasige Degenerationserscheinungen zu beobachten. Im übrigen glichen die Zellen in Zahl und Form einer normalen Kultur.

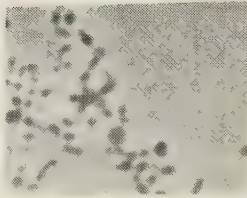
Einwirkung von Tetracyclin:

MCC: Bereits nach 1 und 3 Stunden sah man vereinzelt vergrößerte kugelige Zellen. Von den übrigen normal aussehenden Zellen erschienen einige vergrößert. Nach 5 Stunden waren vermehrt dunkle Zellen zu sehen (Abbildung 10a). Vereinzelt fanden sich kurze Fäden, die an Länge und Zahl nach 7 und 10 Stunden zunahmen (Abbildung 10b). Nach 7 Stunden verblieben neben den Fäden nur noch abgerundete, vergrößerte Zellen. Nach 24 Stunden waren nur noch blasse aufgetriebene Vakuolen vorhanden (Abbildung 10c).

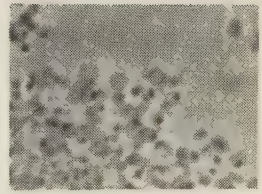
Halbe MCC: Bis zur 5. Stunde zeigten sich keine deutlichen Veränderungen. Nach der 7. Stunde bildeten sich Fäden aus, es erschienen vermehrt große runde Zellen. Die Zahl der Zellen war geringfügig vermehrt. Nach 10 Stunden waren die Fäden verschwunden, die verbliebenen Zellen waren groß und sehr dunkel. Nach 24



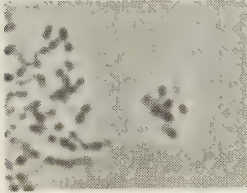
a



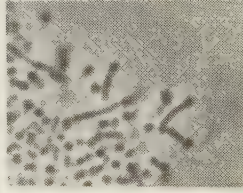
b



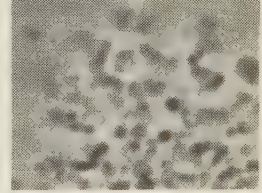
c



d

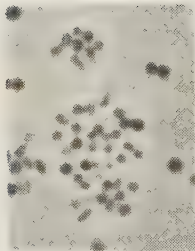


e

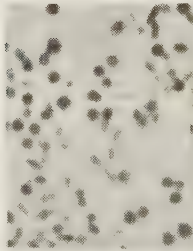


f

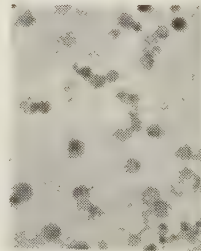
9. Veränderungen von M.hominis unter Einwirkung von Streptomycinsulfat
MCC-Konzentration, nach: a) 5 St. b) 7 St. c) 24 St.
halber MCC-Konzentration, nach: d) 5 St. e) 7 St. f) 24 St.



a



b



c

10. Veränderungen von M.hominis unter Einwirkung von Tetracyclin
MCC-Konzentration, nach: a) 5 St. b) 10 St. c) 24 St.

Stunden waren nur noch blasse, aufgetriebene Vakuolen vorhanden.

MIC und halbe MIC: Bei beiden Konzentrationen vermehrten sich die Zellen, sichere Veränderungen waren nicht festzustellen.

Einwirkung von Tylosin:

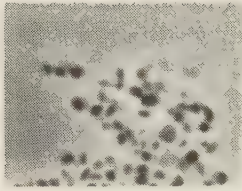
MCC: Beginnend nach der 1. Stunde (Abbildung 11a) fanden sich vergrößerte Zellen, deren Zahl sich bis zur 6. Stunde vermehrte (Abbildung 11b). Daneben fanden wir völlig intakte Zellen. Nach 6 Stunden begannen sich längere Fäden auszubilden. Die Zahl der Zellen nahm insgesamt zu. Nach 8 Stunden fanden sich vereinzelt noch große vakuolige Zellen. Die meisten Zellen erschienen unverändert. Nach 24 Stunden fand offensichtlich keine Vermehrung mehr statt. Normale Zellen waren nicht mehr zu sehen, nur noch große und vakuolige Strukturen (Abbildung 11c).

Halbe MCC: In den ersten 6 Stunden veränderten sich die Zellen nicht. Nach 8 Stunden fanden sich vermehrt kurze Fäden, ohne sonstige Degenerationserscheinungen. Die Zellzahl hatte zugenommen. Nach 24 Stunden jedoch war die überwiegende Zahl der Zellen degenerativ verändert (Abbildung 11d).

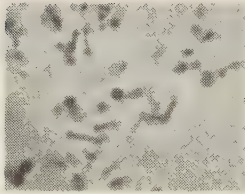
MIC und halbe MIC: Bei diesen Konzentrationen ließen sich keine besonderen Veränderungen feststellen.

b. M.pneumoniae

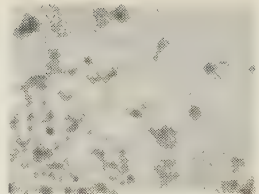
Normales Aussehen: Die Zellen von M.pneumoniae bilden normalerweise ein unregelmäßiges Netzwerk am Glas, das durch die Interaktion von beweglichen mit ruhenden Zellen entsteht (Abbildung 12). Ein Teil der Zellen bildet große kolonieartige Zusammenballungen. Grundstrukturen sind be-



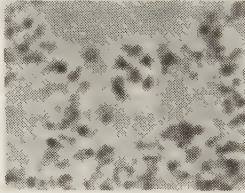
a



b

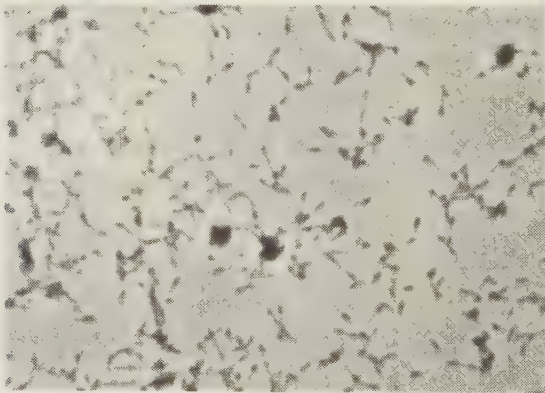


c



d

11. Veränderungen von M.hominis unter Einwirkung von Tylosin
MCC-Konzentration, nach: a) 1 St. b) 6 St. c) 24 St.
halber MCC-Konzentration, nach: d) 24 St.



12. Normales Aussehen von M.pneumoniae

wegliche Einzelzellen von etwa 1 - 2 μm Länge, mit verdicktem Vorderende und dünnem schwanzähnlichem Hinterende. Eine andere typische Form entsteht bei der Teilung, es entwickelt sich eine 1 - 3 μm lange fadenähnliche Struktur mit verdickten Enden. Durch Übereinanderkriechen, Verzweigungen und ähnliche Vorgänge entwickelt sich am Glas das gezeigte Netzwerk.

Einwirkung von Cephaloridin:

32-fache und 16-fache MIC: Bis 7 Stunden blieben die Zellen intakt (Abbildung 13a). Nach 24 Stunden fanden sich gelegentlich verlängerte Fäden und kleine abgerundete Strukturen (Abbildung 13b). Eine Vermehrung hatte nicht stattgefunden.

MIC und halbe MIC: Hier wurde als Einziges eine leichte Vermehrung beobachtet. Die Zellen blieben in ihrer Form erhalten.

Einwirkung von Chloramphenicol:

MCC: Nach 1 1/2 Stunden (Abbildung 14a) begann eine Verlängerung der Fäden, die nach 6 und 8 Stunden deutlich ausgeprägt war. Die Zellen sahen jedoch noch intakt aus. Bis 24 Stunden waren keine weiteren Veränderungen, aber auch keine Vermehrung erkennbar (Abbildung 14b). Nach 48 Stunden fanden sich irreguläre Strukturen mit klumpigen, unregelmäßigen Verdickungen (Abbildung 14c).

Halbe MCC, MIC, halbe MIC: Bei der halben MCC und MIC erschienen die Zellen nach 48 Stunden leicht verdickt. Bei der halben MIC sind keine Veränderungen festzustellen. Bei allen 3 Konzentrationen haben sich die Zellen vermehrt.

Einwirkung von Colistin:

MCC: Nach 4 Stunden begannen sich die Fäden zu verlängern (Abbildung 15a), sie erschienen dünner. Dieser Vorgang setzte sich bis zur 9. Beobachtungsstunde fort (Abbildung 15b). Nach 24 Stunden waren die Zellen zum Teil kugelförmig fragmentiert oder zerstört (Abbildung 15c). Nach 48 Stunden hatte sich dieser Prozeß fortgesetzt (Abbildung 15d). Nur noch vereinzelt fanden sich fadenähnliche Strukturen, die übrigen Zellen waren zerstört. Sie hatten sich in kugelige Fragmente umgewandelt, die teilweise miteinander verklumpt waren. Eine Vermehrung hatte nicht stattgefunden.

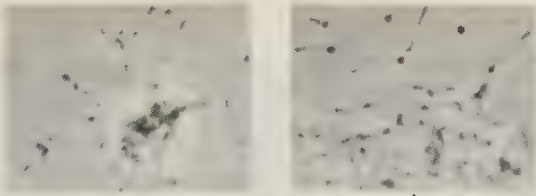
Halbe MCC: Nach 9 Stunden beobachtete man eine Verlängerung der Fäden (Abbildung 15e). Nach 24 Stunden fanden sich mehrfach unregelmäßige Konturen (Abbildung 15f). Nach 48 Stunden waren die Fäden sehr dünn, die Konturen waren teilweise irregulär (Abbildung 15g). Es fanden sich immer noch für M.pneumoniae typische Strukturen.

MIC und halbe MIC: Die Zellen zeigten keine Formveränderungen, ihre Zahl nahm deutlich zu.

Einwirkung von Erythromycin:

MCC: Nach 6 Stunden begann eine deutliche Verlängerung der Fäden (Abbildung 16a). Einige von ihnen hatten nach 9 Stunden ihre Länge vervielfacht (Abbildung 16b). Nach 24 Stunden (Abbildung 16c) fanden sich fast nur noch sehr lange, feine Fäden, die teilweise fragmentiert waren. Andere Zellen waren verdickt und zeigten unregelmäßige Konturen. Nach 48 Stunden war dieser Prozeß weiter fortgeschritten (Abbildung 16d).

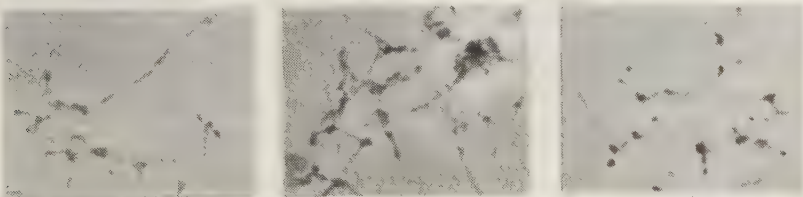
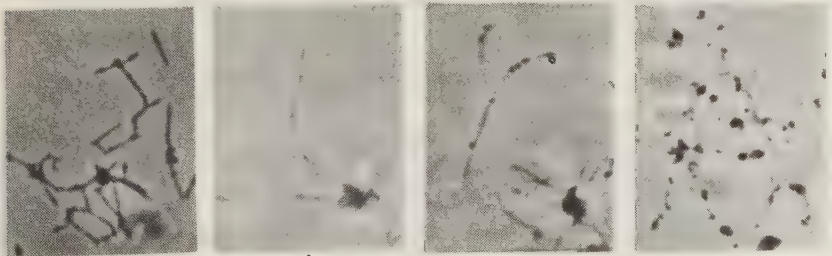
Halbe MCC: Während der ersten 24 Stunden fanden sich keinerlei Veränderungen. Erst nach 48 Stunden traten reichlich



13. Veränderungen von M.pneumoniae unter Einwirkung von Cephaloridin.
MCC-Konzentration, nach: a) 7 St. b) 24 St.



14. Veränderungen von M.pneumoniae unter Einwirkung von Chloramphenicol.
MCC-Konzentration: a) 1 St. b) 24 St. c) 48 St.



15. Veränderungen von M.pneumoniae unter Einwirkung von Colistin.
MCC-Konzentration, nach: a) 4 St. b) 9 St. c) 24 St. d) 48 St.
halber MCC-Konzentration, nach: e) 9 St. f) 24 St. g) 48 St.

fragmentierte deutlich verlängerte Fäden auf. Eine Vermehrung fand nicht statt.

MIC: Nach 9 Stunden begannen die Fäden sich zu verlängern. Nach 24 und 48 Stunden hatten einige die doppelte und dreifache Länge erreicht (Abbildung 16e). An den Berührungstellen der Fäden hatten sich oft Verdickungen gebildet. Man fand nur gelegentlich Fragmentierungen.

Halbe MIC: Die Fäden verlängerten sich nach 24 Stunden. Man fand keine Fragmentierung oder Verdickung. Die Zellen hatten sich mäßig vermehrt.

Einwirkung von Resochin:

MCC: Bereits nach 2 Stunden begannen die Fäden länger und dünner auszusehen (Abbildung 17a). Dieser Vorgang setzte sich bis zur 7. Stunde fort (Abbildung 17b). Nach 24 Stunden waren die Fäden lang und teilweise stark fragmentiert (Abbildung 17c). Eine Vermehrung fand nicht statt.

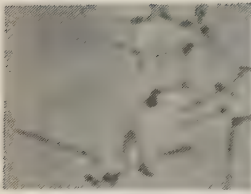
Halbe MCC und MIC: Sichere morphologische Veränderungen waren bis zur 24. Stunde nicht zu erkennen, eine Vermehrung fand ebenfalls nicht statt.

Halbe MIC: Die Zellen hatten sich stark vermehrt, sie hatten sich nicht verändert.

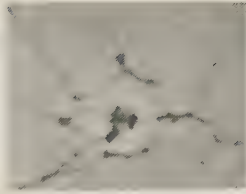
Einwirkung von Streptomycinsulfat:

MCC: Während der ersten 24 Stunden erschienen die Zellen unverändert (Abbildung 18a). Nach 24 Stunden hatten sie sich abgekugelt oder verkürzt (Abbildung 18b). Die Fadenzköpfe waren teilweise sehr stark aufgetrieben. Nach 48 Stunden hatten die Auftreibungen zugenommen (Abbildung 18c). Die Zellen boten das Bild einer kugeligen Degeneration.

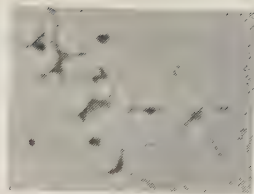
Halbe MCC: Bis zu 24 Stunden traten keine Veränderungen auf. Nach 48 Stunden waren nur noch abgerundete Strukturen



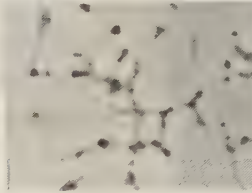
a



b



c

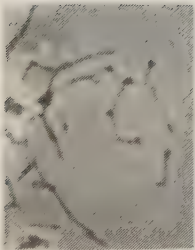


d

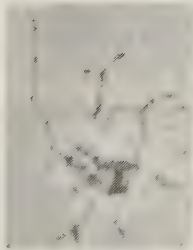


e

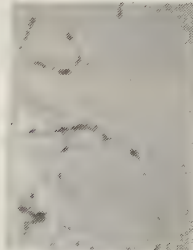
16. Veränderungen von M.pneumoniae unter Einwirkung von Erythromycin
MCC-Konzentration, nach: a) 6 St. b) c) 24 St. d) 48 St.
MIC-Konzentration, nach: e) 48 St.



a



b



c

17. Veränderungen von M.pneumoniae unter Einwirkung von Resochin
MCC-Konzentration, nach: a) 2 St. b) 7 St. c) 24 St.

zu sehen (Abbildung 18d).

Halbe MIC und MIC: Die Zellen vermehrten sich und blieben unverändert.

Einwirkung von Tetracyclin:

MCC: Nach 6 und 8 Stunden fanden sich deutlich verlängerte Fäden (Abbildung 19a). Nach 24 und auch 48 Stunden (Abbildung 19b und c) hatten sich die Strukturen nicht wesentlich verändert oder vermehrt. Segmentierungen fanden nicht statt, die Verbindungsstellen der Fäden erschienen häufig verdickt.

Halbe MCC: Nach 6 Stunden begannen die Fäden sich zu verlängern (Abbildung 19d). Nach 48 Stunden erschienen die Fäden teilweise geschwollen, Fragmentierungen waren kaum zu sehen (Abbildung 19e). Eine Vermehrung hatte nicht stattgefunden.

MIC und halbe MIC: Die Zellen vermehrten sich und blieben unverändert.

Einwirkung von Tylosin:

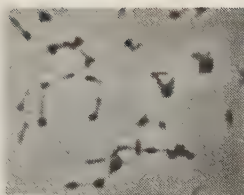
MCC: Bis zu 9 Stunden traten einzelne Fragmentierungen auf (Abbildung 20a). Nach 24 Stunden zeichnete sich zusätzlich eine teilweise Verdickung und Verlängerung der Fäden ab (Abbildung 20b). Nach 48 Stunden war die normale Struktur nur noch angedeutet erkennbar (Abbildung 20c). Alle Zellen erschienen geschwollen.

MIC: Bis 25 Stunden sind keine Veränderungen erkennbar. Nach 48 Stunden haben sich die Fadenstrukturen leicht verdickt und verlängert.

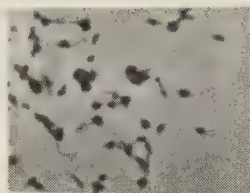
Halbe MIC: Zeigt keine Veränderungen. Die Zellen haben sich deutlich vermehrt.



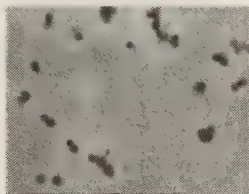
a



b

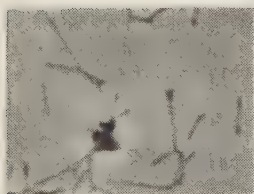


c



d

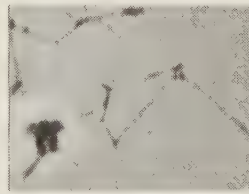
18. Veränderungen von M.pneumoniae unter Einwirkung von Streptomycin
MCC-Konzentration, nach: a) 1 St. b) 24 St. c) 48 St.
halber MCC-Konzentration, nach: d) 48 St.



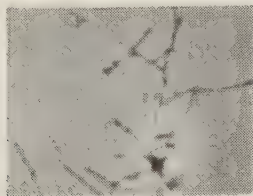
a



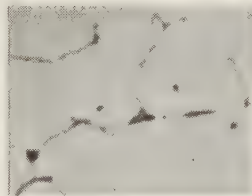
b



c



d



e

19. Veränderungen von M.pneumoniae unter Einwirkung von Tetracyclin
MCC-Konzentration, nach: a) 6 St. b) 24 St. c) 48 St.
halber MCC-Konzentration, nach: d) 6 St. e) 48 St.

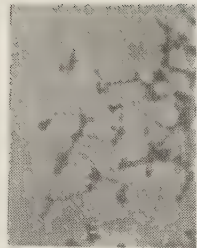
Die unter Einwirkung der MCC auftretenden Veränderungen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Hierbei sind die Antibiotica nach ihren Wirkungsmechanismen geordnet.



a



b



c

20. Veränderungen von M.pneumoniae unter Einwirkung von Tylosin
MCC-Konzentration, nach: a) 9 St. b) 24 St. c) 48 St.

Untersuchtes Antibioticum	Wirkungsbeginn	Beobachtete Erscheinungen bei <u>M.hominis</u>
Nystatin	10 Min.	Rundung, Schwellung, Vacuolisierung
Colistin	-	n.d.
Chloramphenicol	1 St.	Schwellung, Vacuolisierung, Zelltrümmer
Tetracyclin	1 St.	Schwellung, Fadenbildung, Vacuolisierung
Erythromycin	3 St.	Schwellung, Vacuolisierung
Streptomycin	5 St.	Fadenbildung, Schwellung, Vacuolisierung
Tylosin	1 St.	Schwellung, Fadenbildung, Vacuolisierung
Cephaloridin	5 St.	Schwellung, Vacuolisierung, Zelltrümmer
Resochin	1 St.	Schwellung, Vacuolisierung

Untersuchtes Antibioticum	Wirkungsbeginn	Beobachtete Erscheinungen bei <u>M.pneumoniae</u>
Nystatin	-	n.d.
Colistin	4 St.	Verlängerung, Fragmentierung, Abkuglung
Chloramphenicol	1 1/2 St.	Verlängerung, Schwellung
Tetracyclin	6 St.	Verlängerung, teilweise Schwellung
Erythromycin	6 St.	Verlängerung, Fragmentierung, Schwellung
Streptomycin	24 St.	Abkuglung, Auftreibung
Tylosin	9 St.	Verlängerung, Fragmentierung, Schwellung
Cephaloridin	7 St.	geringe Veränderungen
Resochin	2 St.	Verlängerung, Fragmentierung

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen bei Anwendung der MCC.

n.d. = nicht durchgeführt

Diskussion

Untersuchungstechnik

Für die Darstellung des Einflusses von Antibiotica auf die Zellform der Mycoplasmen war es zunächst erforderlich, verschiedene Konzentrationen zu bestimmen. Mit der minimalen Hemmkonzentration (MIC) wurde diejenige Konzentration ermittelt, bei der die Keime zwar im Stoffwechsel behindert, jedoch noch nicht abgetötet wurden. Die mycoplasmocide Konzentration (MCC) hingegen tötet die Keime innerhalb der Versuchsdauer (24 - 48 Std.) ab. Von den beiden Konzentrationen ließen sich unter Umständen unterschiedliche morphologische Effekte erwarten.

Die Bestimmung von MIC und MCC erfolgte mit Einsaaten, die sich in der Wachstumsphase befanden, da diese bei den meisten Antibiotica bessere Angriffspunkte erwarten ließen. Allerdings berichtete FALLON (10) über gleichartige Hemmwerte bei Verwendung von wachsenden und eingefrorenen Mycoplasmen.

Bei der notwendigen Vorbebrütung der eingefrorenen Keime zeigte es sich, daß M.hominis wesentlich schneller die Ruhephase beendete (4 Stunden) als M.pneumoniae (20 Stunden). Diese Verzögerung dürfte mit dem allgemein langsameren Wachstum von M.pneumoniae zu erklären sein. Der Abfall der kbE/ml nach 22 Stunden resultiert wahrscheinlich aus der beginnenden Zusammen-

ballung der Keime.

Bei der Ermittlung der Hemmwerte (MIC) zeigte es sich, daß nur die Frühwerte, das heißt der Zeitpunkt des beginnenden Farbumschlages, reproduzierbar waren. Der Frühwert blieb jeweils, auch bei unterschiedlich hohen Keimeinsaat konstant, während bei den Spätwerten (Ablesung erst nach beendetem Farbumschlag) unregelmäßige Werte und eine deutliche Abhängigkeit von der Größe des Inoculums zu beobachten waren. Insgesamt lagen die Spätwerte deutlich höher als die Frühwerte. Die Zuverlässigkeit der Frühwerte stimmt mit den Erfahrungen anderer Autoren überein (16, 21). Für die weiteren Untersuchungen wurden daher ausschließlich die Frühwerte als MIC verwendet.

Die in den Versuchen ermittelten Antibioticakonzentrationen stimmen in den meisten Fällen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (Tabelle 5).

Graduelle Unterschiede dürften mit der Verwendung unterschiedlicher Stämme oder Variationen der Technik zu erklären sein. Lediglich bei der Wirkung der Cephalosporine auf M.pneumoniae lagen die eigenen Werte wesentlich unter den bisher ermittelten Hemmkonzentrationen (Tabelle 5). Eine Erklärung ist hier zunächst nicht möglich. Cephalosporine lassen auf Grund ihres Angriffspunktes zunächst überhaupt keine Wirkung auf Mycoplasmen erwarten. Hier müssen andere Mechanismen dieser Stoffgruppe

diskutiert werden (10). Hieraus erklärt sich vermutlich auch das Fehlen einer abtötenden Wirkung der Cephalosporine. Eine ähnliche unerwartete und zunächst nicht erklärbare Wirkung auf M. neurolyticum wurde auch für Penicillin berichtet (28).

Morphologische Veränderungen

Das Auftreten der ersten Veränderungen lag bei M. pneumoniae in den meisten Fällen später als bei M. hominis. Dies ergibt sich wahrscheinlich aus dem schnellen Wachstum von M. hominis. Darüber hinaus bestehen noch erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Antibiotica. Das membranwirksame Nystatin bewirkte bei M. hominis bereits nach 10 Minuten drastische Veränderungen. Hier dürfte der Angriffspunkt dieses Antibioticums am Cholesterin der Membran eine Rolle spielen (26). Das ebenfalls membranwirksame Colistin hingegen läßt bei M. pneumoniae erst nach 4 Stunden erste Veränderungen erkennen.

Bei den an der Proteinsynthese angreifenden Substanzen trat die Wirkung bei M. hominis erst nach 1 - 5 Stunden ein, bei M. pneumoniae waren es 1 1/2 - 24 Stunden. Chloramphenicol zeigte dabei den schnellsten Effekt, während Streptomycin mit 5 bzw. 24 Stunden relativ langsam sichtbare Wirkung zeigte.

Inwieweit hierbei die Schnelligkeit der Substanzaufnahme eine Rolle spielt, bleibt vorerst offen. Bei Cephaloridin, dessen Wirkmechanismus bei Mycoplasmen unklar ist (10), treten sichtbare

Effekte relativ spät (5 bzw. 7 Stunden) ein. Dies schließt zumindest eine stärkere Wirkung auf die Zellmembran aus. Nach der Zugabe von Resochin traten Zellveränderungen relativ schnell (1 bis 2 Stunden) auf. Die Wirkungsweise dieser Substanz auf Mycoplasmen ist ebenfalls nicht bekannt.

Die Reaktion der Mycoplasmazellen auf die verschiedenen Wirkstoffe war relativ uniform. M.hominis reagierte sowohl bei schnellem als auch bei langsamem Wirkungseintritt mit Schwellung, die dann in eine Vacuolisierung überging. In einigen Fällen waren nach längerer Zeit nur noch Zelltrümmer zu beobachten. Bei einigen Hemmern der Proteinsynthese wurden vorübergehend kurze Fäden gebildet. Möglicherweise wurden hier von dem Eingriff schon sehr früh Substanzen betroffen, die für die Abschnürung der Tochterzellen notwendig sind. Weitere Besonderheiten zeigten sich bei den untersuchten Substanzen nicht.

Bei M.pneumoniae zeigten die Veränderungen einen anderen Verlauf, sie waren jedoch ebenfalls recht einförmig. Die Zellen reagierten bei frühem oder spätem Wirkungseintritt zunächst stets mit Verlängerung der fadenförmigen Zellen. Meist fragmentierten danach die Fäden, dann folgte eine Auftreibung und Schwellung der geschädigten Mycoplasmen. Eine Ausnahme bildete das Streptomycin. Hier fehlte die Verlängerung, nach 24 Stunden war direkt eine Abkuglung und Schwellung zu beobachten. Dieser Effekt ist möglicher-

weise auf die zusätzliche membranspezifische Wirkung von Streptomycin (26) zurückzuführen. Cephaloridin zeigte keine erheblichen Veränderungen, vermutlich hat hier über unklare Mechanismen keine vollständige Abtötung stattgefunden.

Bei der MIC zeigten sich sowohl bei M.hominis als auch bei M.pneumoniae dieselben Reaktionen wie bei der MCC. Die Veränderungen waren jedoch zeitlich und in ihrer Ausgeprägtheit verschoben.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Einwirkung verschiedener Antibiotica bzw. Chemotherapeutica bei den zellwandlosen Mycoplasmen eine relativ einheitlich species-spezifische Reaktion hervorruft. Dies scheint darauf hinzuweisen, daß die Mycoplasmazellen auf verschiedenartige Schädigungen mit gleichförmigen Veränderungen reagieren. Der Zeitpunkt des Wirkungseintritts ist offenbar dabei nicht erheblich.

Tabelle 5:

MIC-Werte der eigenen Untersuchungen im Vergleich zu Werten der Literatur bei M.hominis Werte in μg

	Cephalonid.	Chloramph.	Erythromy.	Nystatin	Streptom.	Tetracy.	Tylosin
Braun (4)	1000,0	0,4	500		0,8	0,05	
Harwik (14)		3,2			11,0	3,2	
Omuva (20)			100,0				6,25
eigene Messungen	244,1	0,79	117,2	73,2	9,76	0,11	0,66

MIC-Werte der eigenen Untersuchungen im Vergleich zu Werten der Literatur bei M.pneumoniae

	Cephalonid.	Chloramph.	Erythromy.	Nystatin	Streptom.	Tetracy.	Tylosin
Fallon (10)	125,0		0,016				
Stuart (24)	100,0	1,5	<4,0		25,0	1,5	
Kukota (16)		3,2	0,008		1,6	0,2	
Jao (15)	192,0	1,6	0,01		0,2	0,06	
Slolkin (23)		5,0	0,01		0,5		
Omuva (20)			< 0,19	25,0			
eigene Messungen	2,3	0,59	0,0012.	29,2	0,78	0,07	0,0027.

Zusammenfassung

Bei Einwirkung von Antibiotica auf Bakterien entstehen mit Ausnahme des Penicillins keine oder nur uncharakteristische Veränderungen der Zellform. Das ist wahrscheinlich auf das Vorhandensein einer formerhaltenden Zellwand zurückzuführen. Absicht der vorliegenden Arbeit war es, die Einwirkung von Antibiotica auf die Form der zellwandlosen Mycoplasmen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die minimale Hemmkonzentration und die mycoplasmocide Konzentration einer jeden untersuchten Substanz bestimmt. Danach wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen auf die Zellform zweier beim Menschen vorkommender Mycoplasmaarten, Mycoplasma hominis und Mycoplasma pneumoniae, mikroskopisch geprüft. Untersucht wurden klinisch verwendbare Antibiotica und Chemotherapeutica mit Angriffspunkt an der Cytoplasmamembran (Nystatin, Colistin), an die Proteinsynthese (Chloramphenicol, Tetracyclin, Tylosin, Erythromycin, Streptomycin), an der Zellwand (Cephaloridin) und mit unklarem Angriffspunkt, aber bekannter Mycoplasma-Wirkung (Resochin).

Die ermittelten Hemmkonzentrationen stimmten bis auf wenige Ausnahmen mit den Werten der Literatur überein. Die Mycoplasmazellen reagierten auf die Einwirkung der verschiedenen Substanzen relativ uniform, aber species-spezifisch. Bei den eher

runden M.hominis-Zellen fanden sich Schwellung, Vacuolisierung bis hin zu Zelltrümmern. Die meist gestreckten Zellen von M.pneumoniae verlängerten sich, fragmentierten und schwellen an. Das membranwirksame Nystatin bewirkte bei M.hominis erste Veränderungen schon nach 10 Minuten, die übrigen Substanzen zeigten erste Effekte nach 1 - 24 Stunden. Die Wirkungsweise von Cephaloridin auf die zellwandlosen Mycoplasmen ist vorerst unklar.

Die untersuchten Mycoplasmen zeigten somit deutliche species-spezifische morphologische Veränderungen, die jedoch von der Art des einwirkenden Antibioticums oder Chemotherapeuticums weitgehend unabhängig sind.

Literatur

1. ALLISON, J.L., HARTMANN, R.E., HARTMANN, R.S.,
WOLFE, A.D., CIAK, J., HAHN, F.E., 1962
Mode of action of chloramphenicol.
J. Bact. 83, 609-615.
2. BREDT, W., 1968
Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen zu Morphologie und Vermehrung von Mycoplasma pneumoniae an Glas.
Zbl. Bakt., I Abt. Orig. 208, 549-562.
3. BREDT, W., 1970
Experimentelle Untersuchungen über Morphologie und Vermehrung der beim Menschen vorkommenden Mycoplasmen unter besonderer Berücksichtigung von M.hominis.
Z.Med.Mikrobiol.Immunol. 155, 248-274.
4. BRAUN, P., KLEIN, J.O., KASS, E.H., 1970
Susceptibility of Genital Mycoplasmas to antimicrobial agents.
Appl. Microbiol. 19, 62-70.
5. DIENES, L., 1968
Morphology and reproductive processes of bacteria with defective cell wall
In: Guze, L.B. (ed.)
Microbial protoplasts, spheroplasts and L-Forms.
The Williams and Wilkins Company Baltimore, S.74-93.
6. EDWARD, D.G.ff, FREUNDT, E.A., 1956
The classification and nomenclature of organism of the pleuropneumonia group.
J. gen. Microbiol. 14, 197-207.

7. EDWARD, D.G.ff , FREUNDT, E.A. 1967
Proposal for Mollicutes as a name of the class established
for the order Mycoplasmatales.
Int.J.system Bact. 17 , 267-268.
8. FRANKLIN, T.J., SNOW, G.A. 1973
Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe.
Springer Verlag, Berlin.
9. FREUNDT, E.A. 1969
Cellular morphology and mode of replication of the
mycoplasmas.
In: Hayflick, L. (ed.)
The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria.
North Holland Publishing Comp., Amsterdam, S. 281-313.
10. FALLON, R.J. 1970
The effect of cephaloridine and a cephalosporin derivative
on mycoplasma.
J.appl.Bact. 33 , 744-749.
11. WALTER, A.M., PLEMPEL, M. 1969
Grundbegriffe der Chemotherapie
In: Grumbach, A., Kikuth, W. (ed.)
Die Infektionskrankheiten der Mensch und ihre Erreger,
Bd. I, Thieme Verlag, Stuttgart.
12. HAYFLICK, L. 1965
Tissue cultures and mycoplasmas.
Texas Rep.Biol.Med. 23 , Suppl. 1 285-303.
13. HAYFLICK, L., CHANOCK, R.M. 1965
Mycoplasma species of man.
Bact.Rev. 29 , 185-221.

14. HARWIK, H.J., FEKETY, F.R. jr. 1969
The antibiotic susceptibility of Mycoplasma hominis .
J.clin.Path. 22 , 483-485.
15. JAO, L. 1967
Susceptibility of Mycoplasma pneumoniae to 21
antibiotics in vitro.
Amer.J.Med.Sci. 253 , 639-650.
16. KUBOTA, H. 1973
Antibiotic susceptibility of Mycoplasma pneumoniae
in vitro: susceptibility of laboratory strains and 152
isolates.
Sci,Rep.Res.Inst.Tohoku Univ.-C., 20 , 55-70.
17. MATTMAN, L.H. 1974
Cell wall deficient forms.
CRC Press, Cleveland/Ohio.
18. MORGAN, C., ROSENKRANZ, H.S., CARR, S.H.,
ROSE, H.M. 1967
Electron microscopy of chloramphenicol-treated
Escherichia coli.
J.Bact. 93 , 1987-2002.
19. NOCARD, ROUX, BORREL, SALIMBENIET et DUJARDIN-
BEAUMETZ 1898
Le microbe de la pérripneumonie.
Ann.Inst.Pasteur 12 , 240-262.
20. OMURA, S., HIRONAKA, Y., NAKAGAWA, A.,
UMEZAWA, I., HATA, T. 1972
Antimycoplasma activities of macrolide antibiotics
J.Antibiotics 25 , 105-108.

21. PURCELL, R.H., WONG, D., CHANOCK, R.M., TAYLOR-ROBINSON, D., CANCHOLA, J., VALDESUSO, J. 1967
Significance of antibody to mycoplasma as measured by metabolic inhibition techniques
Ann.N.Y.Acad.Scienc. 143 , 664-675.
22. SALLE, A.J. 1961
Fundamental principles of bacteriology.
McGraw-Hill Book Comp., New York
23. SLOTKIN, R.J., CLYDE, W.A., DENNY, F.W.
The effect of antibiotics on Mycoplasma pneumoniae
in vitro and in vivo.
Amer. J. Epidem. 86, 225-237.
24. STEWART, S.M., BURNET, M.E., YOUNG, J.E. 1969
In-vitro sensitivity of strains of mycoplasmas from human sources to antibiotics and to sodium aurothiomalate and tylosin tartrate
R. J. Med.Microbiol. 2 , 287-292.
25. TAYLOR-ROBINSON, D. 1967
Mycoplasmas of various hosts and their antibiotic sensitivities.
Postgrad, Med.J. (Suppl.) 43 , 100-104.
26. WALTER, A.M., HEILMAYER, L. 1965
Antibiotika Fibel
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
27. WINKLER, A. 1969
Morphologie und Vermehrungsmechanismus der Bakterien.
In: Grumbach, A., Bonin, O. 187-210
Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger. S. 187-210.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

28. WRIGHT, D.N. 1967

Nature of penicillin induced growth inhibition of

Mycoplasma neurolyticum

J.Bact. 93, 185-190.

Lebenslauf

Ich, Knut Albrecht Schneider, Sohn des Dermatologen Dr.med. Armin Schneider und seiner Ehefrau Lucie, geborene Ulrich, bin am 14.7.47 in Magdeburg geboren. Im Alter von 7 Jahren wurde ich in Magdeburg eingeschult. 1961 wechselten meine Eltern und ich in die Bundesrepublik Deutschland über. Im Juni 1968 legte ich die Reifeprüfung im Aufbau-gymnasium in Friedberg ab. Nachdem ich das kleine Latinum extern erworben hatte, immatrikulierte ich mich für das Studium der Zahnmedizin im Winter 69. Am 2.4.1970 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 6.10.1971 die zahnärztliche Vorprüfung und am 28.5.1974 das Staatsexamen in der Zahnheilkunde ab. Ich arbeite seit dem 1.8.74 in einer zahnärztlichen Praxis in Simmern/Hunsrück als zahnärztlicher Assistent.



